

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-262799

(43) 公開日 平成4年(1992)9月18日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68		Z 8114-4B		
C 1 2 N 15/10				
C 1 2 Q 1/68	Z N A	A 8114-4B		
// A 6 1 B 10/00		T 7831-4C		
		8828-4B		
			C 1 2 N 15/00	A
			審査請求 未請求	請求項の数 5 (全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平3-46193

(22) 出願日 平成3年(1991)2月18日

(71) 出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72) 発明者 青野 利哉

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡績株式会社総合研究所内

(72) 発明者 宝田 裕

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡績株式会社総合研究所内

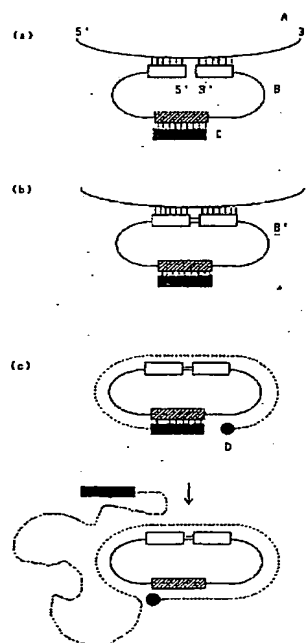
(54) 【発明の名称】 核酸配列の増幅方法およびそのための試薬キット

(57) 【要約】

【目的】 標的とする核酸を簡便に増幅させる。

【構成】 検体試料中の標的核酸配列 (A) に、該標的核酸配列 (A) の存在の結果として環状化するように設計された配列を有する直鎖状プローブヌクレオチド (B) をハイブリダイズさせ、該直鎖状プローブヌクレオチド (B) を環状化した環状プローブヌクレオチド (B') を鋳型とし、上記直鎖状プローブヌクレオチド (B) と部分的に相補的な配列を有するプライマーヌクレオチド (C) を利用し、鋳型と相補的な配列の繰り返した配列を有する一本鎖核酸を生成させることにより、核酸配列を増幅させる。

【効果】 非特異反応が抑制され、特定の配列のみを増幅することが可能である。また、ヘリカーゼ様活性を有する核酸ポリメラーゼを用いることにより、環状化したプローブヌクレオチド1分子から複数の核酸配列が生成されるので、効率よく増幅することが可能である。



1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 検体試料中の標的核酸配列(A)の存在の結果として環状化するように設計された配列を有する直鎖状プローブヌクレオチド(B)と、少なくともこの直鎖状プローブヌクレオチド(B)と部分的に相補的な配列を有するプライマーヌクレオチド(C)を用いて、標的核酸配列(A)に直鎖状プローブヌクレオチド(B)をハイブリダイズさせ、直鎖状プローブヌクレオチド(B)を環状化し、生成した環状プローブヌクレオチド(B')を鋳型として、プライマーヌクレオチド(C)を利用し、鋳型と相補的な配列の繰り返した配列を有する一本鎖核酸を生成させることにより、核酸配列を増幅させることを特徴とする核酸配列の増幅方法。

【請求項2】 検体試料中の標的核酸配列(A)の存在の結果として環状化するように設計された配列を有する直鎖状プローブヌクレオチド(B)と、少なくとも該直鎖状プローブヌクレオチド(B)と部分的に相補的な配列を有するプライマーヌクレオチド(C)を用いて、下記の操作(a)～(e)を行うことを特徴とする核酸配列の増幅方法。

操作(a)：上記直鎖状プローブヌクレオチド(B)と標的核酸配列(A)とのハイブリッドを形成させる。

操作(b)：プライマーヌクレオチド(C)を操作(a)で生成したハイブリッド中のプローブヌクレオチド(B)とアニールさせる。

操作(c)：操作(b)で生成したアニール物中の直鎖状プローブヌクレオチド(B)の5'末端と3'末端を連結させて、環状ヌクレオチド(B')とする。

操作(d)：操作(c)で生成した環状ヌクレオチド(B')を鋳型とし、ヘリカーゼ様活性を有する核酸ポリメラーゼおよびプライマーヌクレオチド(C)を利用して核酸配列を増幅させる。

操作(e)：必要により、操作(d)で生成した増幅核酸配列を用いて、操作(a)～(d)を少なくとも1回繰り返す。

【請求項3】 検体試料中の標的核酸配列(A)の存在の結果として環状化するように設計された配列を有する直鎖状プローブヌクレオチド(B)と、少なくとも該直鎖状プローブヌクレオチド(B)と部分的に相補的な配列を有するプライマーヌクレオチド(C)を用いて、下記の操作(a)～(e)を行うことを特徴とする核酸配列の増幅方法。

操作(a)：上記直鎖状プローブヌクレオチド(B)とプライマーヌクレオチド(C)とのハイブリッドを形成させる。

操作(b)：検体試料中の標的核酸(A)を、操作(a)で生成したハイブリッド中のプローブヌクレオチド(B)とアニールさせる。

操作(c)：操作(b)で生成したアニール物中の直鎖状プローブヌクレオチド(B)の5'末端と3'末端を

2

連結させて、環状ヌクレオチド(B')とする。

操作(d)：操作(c)で生成した環状ヌクレオチド(B')を鋳型とし、ヘリカーゼ様活性を有する核酸ポリメラーゼおよびプライマーヌクレオチド(C)を利用して核酸配列を増幅させる。

操作(e)：必要により、操作(d)で生成した増幅核酸配列を用いて、操作(a)～(d)を少なくとも1回繰り返す。

【請求項4】 検体試料中の標的核酸配列(A)の存在の結果として環状化するように設計された配列を有する直鎖状プローブヌクレオチド(B)と、少なくとも該直鎖状プローブヌクレオチド(B)と部分的に相補的な配列を有するプライマーヌクレオチド(C)を用いて、下記の操作(a)～(d)を行うことを特徴とする核酸配列の増幅方法。

操作(a)：上記直鎖状プローブヌクレオチド(B)、標的核酸配列(A)およびプライマーヌクレオチド(C)とのハイブリッドを形成させる。

操作(b)：操作(a)で生成したハイブリッド中の直鎖状プローブヌクレオチド(B)の5'末端と3'末端を連結させ、環状ヌクレオチド(B')とする。

操作(c)：操作(b)で生成した環状ヌクレオチド(B')を鋳型とし、ヘリカーゼ様活性を有する核酸ポリメラーゼおよびプライマーヌクレオチド(C)を利用して核酸配列を増幅させる。

操作(d)：必要により、操作(c)で生成した増幅核酸配列を用いて、操作(a)～(c)を少なくとも1回繰り返す。

【請求項5】 検体試料中の標的核酸配列(A)の存在の結果として環状化するように設計された配列を有する直鎖状プローブヌクレオチド(B)と、少なくとも該直鎖状プローブヌクレオチド(B)と部分的に相補的な配列を有するプライマーヌクレオチド(C)を用いて、下記の操作(a)～(e)を行うことを特徴とする核酸配列の増幅方法。

操作(a)：上記直鎖状プローブヌクレオチド(B)と標的核酸配列(A)とのハイブリッドを形成させる。

操作(b)：操作(a)で生成したハイブリッド中の隣接した直鎖状プローブヌクレオチド(B)の5'末端と3'末端を連結させ、環状ヌクレオチド(B')とする。

操作(c)：プライマーヌクレオチド(C)を操作(b)で生成した環状プローブヌクレオチド(B')とアニールさせる。

操作(d)：操作(c)で生成した環状ヌクレオチド(B')を鋳型とし、ヘリカーゼ様活性を有する核酸ポリメラーゼおよびプライマーヌクレオチド(C)を利用して核酸配列を増幅させる。

操作(e)：必要により、操作(d)で生成した増幅核酸配列を用いて、操作(a)～(d)を少なくとも1回

繰り返す。

【請求項6】 検体試料中の標的核酸配列(A)の存在の結果として環状化するように設計された配列を有する直鎖状プローブヌクレオチド(B)、該直鎖状プローブヌクレオチド(B)と部分的に相補的な配列を有するプライマーヌクレオチド(C)、連結手段、核酸ポリメラーゼおよびヌクレオチド三リン酸を含む核酸増幅用試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は核酸の増幅方法およびそのための試薬キットに関する。この発明は特に、塩基配列が既知の核酸を、その初期に存在する量に比較して、より大量に生成させる方法に関する。本発明を実施することにより、遺伝病、癌、感染症などの診断を行うことが容易となる。

【0002】

【従来技術】 近年、ハイブリダイゼーションによる核酸の検出は遺伝病、癌、感染症などの診断のために有効な手段として汎用されるようになってきた。核酸検出法において、標的とする塩基配列は、対象となる核酸のほんの僅かな部分である場合があり、非放射性標識プローブや末端を放射性同位体で標識したオリゴヌクレオチドプローブを用いた検出法では、感度上の問題等によりその検出が困難である。そのため、プローブ検出システムの感度を向上させるための努力が多くなされている(W087/03622など)。また、感度向上の手段として、標的とする核酸をDNAポリメラーゼにより増幅させる方法(特開昭61-274697号公報;以下「PCR」と略することがある)が開示されている。しかし、この方法では複雑な温度の調節が必要であり、専用の機器を必要とするという欠点がある。

DNAリガーゼを用いる増幅法も開示されている(W089/12696、特開平2-2934号公報など)。しかし、これらの方法ではDNAリガーゼが平滑末端を連結する反応(blunt end ligation)により非特異的増幅が起こる。この問題の回避法として、W089/12696では3組以上のプローブを用いているが、プローブ数が多くコスト高になってしまう欠点がある。また、RNAポリメラーゼを用いてDNAよりRNAが生成されることは周知であり、RNAポリメラーゼを用いて核酸の増幅を行う方法も開示されている(W089/01050)。しかしながら、この方法ではRNAポリメラーゼによる転写増幅のみでは十分な増幅は困難である。従って、生成したRNAに再度逆転写酵素を作用させDNAを生成させる操作を実施している。一方、標的とする核酸にプローブをハイブリダイズさせた後、正しくハイブリダイズしたプローブのみを増幅する方法(BIO/TECHNOLOGY vol.6, 1197, 1988)も知られている。しかしこの方法では、非特異反応により結合したプローブも増幅され、ブランク値の上昇をきたすという問題がある。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、標的とする核酸を簡便に増幅させる方法を提供することである。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者らはこれらの課題を解決すべく鋭意研究を進めた結果、プローブとして標的核酸の存在下でのみ環状となりうるヌクレオチドを用いることにより、上記課題が解決されることを見出して、本発明を完成させるに至った。即ち、本発明は検体試料中の標的核酸配列(A)の存在の結果として環状化するように設計された配列を有する直鎖状プローブヌクレオチド(B)と、少なくともこの直鎖状プローブヌクレオチド(B)と部分的に相補的な配列を有するプライマーヌクレオチド(C)を用いて、標的核酸配列(A)に直鎖状プローブヌクレオチド(B)をハイブリダイズさせ、直鎖状プローブヌクレオチド(B)を環状化し、生成した環状プローブヌクレオチド(B')を鋳型とし、プライマーヌクレオチド(C)を利用し、鋳型と相補的な配列の繰り返し配列を有する一本鎖核酸を生成させることにより、核酸配列を増幅させることを特徴とする核酸配列の増幅方法である。また本発明の核酸を増幅するための試薬キットは、検体試料中の標的核酸配列(A)の存在の結果として環状化するように設計された配列を有する直鎖状プローブヌクレオチド(B)、該直鎖状プローブヌクレオチド(B)と部分的に相補的な配列を有するプライマーヌクレオチド(C)、連結手段、核酸ポリメラーゼおよびヌクレオチド三リン酸を含む核酸増幅用試薬キットである。

【0005】 本発明では、検出したい標的配列とハイブリッドを形成することにより、リガーゼを用いて環状化することが可能となるように設計された核酸分子を使用し、該環状化した核酸分子を鋳型として、ポリメラーゼ反応により核酸配列を増幅させる。本発明における標的核酸(A)は、単鎖でも二重鎖でもよく、比較的純粋な状態であっても、核酸の混合物の成分であってもよい。本発明に関する標的核酸の配列は長さ、構造等に特に制限されない。

【0006】 本発明におけるプローブヌクレオチド(B)とは、検体試料中の標的核酸配列(A)の存在の結果として環状化するように設計された配列を有する直鎖状プローブヌクレオチドである(図1および図2のB参照)。プローブヌクレオチド(B)の5'末端と3'末端は図2に示されるように、標的核酸とアニールする部分を有する。該アニール部分は、それぞれ6~40ヌクレオチド、好ましくは各々10~30ヌクレオチドの長さで使用される。5'末端と3'末端に位置する上記アニール部分間を結ぶ配列の長さは、一般的に1~1000個、好ましくは10~100個のヌクレオチドであればよい。また、この領域にRNAポリメラーゼのアンチプロモータ

5

一配列を含ませることも可能である。このRNAポリメラーゼのアンチプロモーター配列を持ったプローブヌクレオチドを用いた場合、プライマーヌクレオチドとしてRNAポリメラーゼのプロモーター配列を持つヌクレオチドを用いることにより、プロモーターに応じたRNAポリメラーゼ、およびリボヌクレオチド(ATP, CTP, GTP, UTP)を作用させれば、プローブヌクレオチドの相補鎖が繰り返し並んだRNAを合成することが可能である。

【0007】本発明のプライマーヌクレオチド(C)は、プローブヌクレオチド(B)と少なくとも部分的に相補的な配列を有していれば、構造、長さなどに制限されない。長さは一般的には、6~40ヌクレオチド、好ましくは10~30ヌクレオチドが使用される。また、プローブヌクレオチドがRNAポリメラーゼのアンチプロモーター配列を含む場合には、プライマーヌクレオチドにプロモーター配列を含ませたものを使用することが可能である。これらのオリゴヌクレオチド(B)および(C)は、例えばABI社(Applied Biosystems Inc.)のDNAシンセサイザー 391型を用いて、ホスホアミダイト法により合成できる。他にもリン酸トリエステル法、H-ホスホネート法、チオホスファイト法等いかなる方法で合成してもよい。また、生物学的起源、例えば制限エンドヌクレアーゼ消化物から単離してもよい。プローブヌクレオチド(B)の5'末端にはリン酸基を付加しておくことが好ましい。リン酸基の付加は、例えばATPの存在下で、T4ポリヌクレオチドキナーゼにより行うことができる。

【0008】本発明で使用される核酸ポリメラーゼは、ヘリカーゼ様活性を持つ核酸ポリメラーゼであれば、DNAポリメラーゼであっても、RNAポリメラーゼであってもよい。例えばφ29 DNAポリメラーゼを用いれば、環状核酸分子を鋳型として、鋳型と相補的な配列が繰り返し並んだ核酸を合成することが可能である(J. Biol. Chem. 264, 8935, 1989)。他にも、M2 DNAポリメラーゼ、E. coli DNAポリメラーゼIII、T7 RNAポリメラーゼ、T3 RNAポリメラーゼ、SP6 RNAポリメラーゼなどが利用できる。

【0009】本発明の核酸増幅方法は、標的核酸配列(A)に上記直鎖状プローブヌクレオチド(B)をハイブリダイズさせ、直鎖状プローブヌクレオチド(B)を環状化し、生成した環状プローブヌクレオチド(B')を鋳型として、プライマーヌクレオチド(C)を利用し、鋳型と相補的な配列の繰り返しした配列を有する一本鎖核酸を生成させることにより核酸配列を増幅させる。

【0010】本発明の核酸増幅法としては、次のような実施態様が挙げられる。(1)検体試料中の標的核酸配列(A)の存在の結果として環状化するように設計された配列を有する直鎖状プローブヌクレオチド(B)と、少なくとも該直鎖状プローブヌクレオチド(B)と部分

6

的に相補的な配列を有するプライマーヌクレオチド(C)を用いて、下記の操作(a)~(e)を行うことを特徴とする核酸配列の増幅方法。

操作(a):上記直鎖状プローブヌクレオチド(B)と標的核酸配列(A)とのハイブリッドを形成させる。

操作(b):プライマーヌクレオチド(C)を操作(a)で生成したハイブリッド中のプローブヌクレオチド(B)とアニールさせる。

操作(c):操作(b)で生成したアニール物中の直鎖状プローブヌクレオチド(B)の5'末端と3'末端を連結させて、環状ヌクレオチド(B')とする。

操作(d):操作(c)で生成した環状ヌクレオチド(B')を鋳型とし、ヘリカーゼ様活性を有する核酸ポリメラーゼおよびプライマーヌクレオチド(C)を利用して核酸配列を増幅させる。

操作(e):必要により、操作(d)で生成した増幅核酸配列を用いて、操作(a)~(d)を少なくとも1回繰り返す。

【0011】(2)検体試料中の標的核酸配列(A)の存在の結果として環状化するように設計された配列を有する直鎖状プローブヌクレオチド(B)と、少なくとも該直鎖状プローブヌクレオチド(B)と部分的に相補的な配列を有するプライマーヌクレオチド(C)を用いて、下記の操作(a)~(e)を行うことを特徴とする核酸配列の増幅方法。

操作(a):上記直鎖状プローブヌクレオチド(B)とプライマーヌクレオチド(C)とのハイブリッドを形成させる。

操作(b):検体試料中の標的核酸(A)を、操作(a)で生成したハイブリッド中のプローブヌクレオチド(B)とアニールさせる。

操作(c):操作(b)で生成したアニール物中の直鎖状プローブヌクレオチド(B)の5'末端と3'末端を連結させて、環状ヌクレオチド(B')とする。

操作(d):操作(c)で生成した環状ヌクレオチド(B')を鋳型とし、ヘリカーゼ様活性を有する核酸ポリメラーゼおよびプライマーヌクレオチド(C)を利用して核酸配列を増幅させる。

操作(e):必要により、操作(d)で生成した増幅核酸配列を用いて、操作(a)~(d)を少なくとも1回繰り返す。

【0012】(3)検体試料中の標的核酸配列(A)の存在の結果として環状化するように設計された配列を有する直鎖状プローブヌクレオチド(B)と、少なくとも該直鎖状プローブヌクレオチド(B)と部分的に相補的な配列を有するプライマーヌクレオチド(C)を用いて、下記の操作(a)~(d)を行うことを特徴とする核酸配列の増幅方法。

操作(a):上記直鎖状プローブヌクレオチド(B)、標的核酸配列(A)およびプライマーヌクレオチド

7

(C) とのハイブリッドを形成させる。

操作 (b) : 操作 (a) で生成したハイブリッド中の直鎖状プローブヌクレオチド (B) の 5' 末端と 3' 末端を連結させ、環状ヌクレオチド (B') とする。

操作 (c) : 操作 (b) で生成した環状ヌクレオチド (B') を鋳型とし、ヘリカーゼ様活性を有する核酸ポリメラーゼおよびプライマーヌクレオチド (C) を利用して核酸配列を増幅させる。

操作 (d) : 必要により、操作 (c) で生成した増幅核酸配列を用いて、操作 (a) ~ (c) を少なくとも 1 回繰り返す。

【0013】 (4) 検体試料中の標的核酸配列 (A) の存在の結果として環状化するように設計された配列を有する直鎖状プローブヌクレオチド (B) と、少なくとも該直鎖状プローブヌクレオチド (B) と部分的に相補的な配列を有するプライマーヌクレオチド (C) を用いて、下記の操作 (a) ~ (e) を行うことを特徴とする核酸配列の増幅方法。

操作 (a) : 上記直鎖状プローブヌクレオチド (B) と標的核酸配列 (A) とのハイブリッドを形成させる。

操作 (b) : 操作 (a) で生成したハイブリッド中の隣接した直鎖状プローブヌクレオチド (B) の 5' 末端と 3' 末端を連結させ、環状ヌクレオチド (B') とする。

操作 (c) : プライマーヌクレオチド (C) を操作 (b) で生成した環状プローブヌクレオチド (B') とアニールさせる。

操作 (d) : 操作 (c) で生成した環状ヌクレオチド (B') を鋳型とし、ヘリカーゼ様活性を有する核酸ポリメラーゼおよびプライマーヌクレオチド (C) を利用して核酸配列を増幅させる。

操作 (e) : 必要により、操作 (d) で生成した増幅核酸配列を用いて、操作 (a) ~ (d) を少なくとも 1 回繰り返す。

【0014】 本発明の上記実施態様 (3) の理解のために、図 2 に本発明の原理を模式的に示す。以下、図を用いて本発明を説明する。尚、図中 A は標的核酸、B は直鎖状プローブヌクレオチド、B' は環状化プローブヌクレオチド、C はプライマーヌクレオチド、D は核酸ポリメラーゼを示す。

操作 (a) : 直鎖状プローブヌクレオチド (B) 中の検出配列と標的核酸 (A) 中の標的配列とのハイブリッドを形成させる。同時に又は別々にプライマーヌクレオチド (C) を該プローブヌクレオチド (B) にアニールさせる (図 2 (a) 参照)。標的核酸が二重鎖の場合は加熱、アルカリ処理、酸処理などにより変性して一本鎖とする。加熱変性は例えば 80 ~ 105 °C で 1 ~ 5 分間処理することで実施できる。アルカリ処理は例えば、0.2 ~ 1 規定の NaOH 存在下で、1 ~ 30 分間処理し、等量の HCl で中和して用いることができる。酸処理は例えば 0.

8

01 ~ 1 規定の HCl 存在下で、1 ~ 30 分間処理し、NaOH で中和して用いることができる。他の方法として酵素的に鎖分解を行なうこともできる。アニールは、好ましくはプローブヌクレオチド (B) およびプライマーヌクレオチド (C) について、それぞれ、最大のアニール選択性をもたらすように、選択された温度において行う。一般的には標的核酸 (A) とプローブヌクレオチド (B)、およびプローブヌクレオチド (B) とプライマーヌクレオチド (C) がそれぞれ特異的に結合し、且つミスマッチによる非特異的結合が最小となるように、昇温させて行われる。

【0015】 操作 (b) : 上記プローブヌクレオチド (B) の 5' 末端と 3' 末端を連結させ、環状化プローブヌクレオチド (B') とする (図 2 (b) 参照)。該プローブヌクレオチド (B) の 5' 末端と 3' 末端がハイブリッド形成の結果、隣接する場合、T4 DNA リガーゼ、T7 DNA リガーゼ、大腸菌 (*E. coli*) DNA リガーゼ、*Thermus thermophilus* DNA リガーゼ等の連結酵素を使用する方法が好ましい。また互いに隣接していない場合、DNA ポリメラーゼおよび/または逆転写酵素によりギャップを埋めた後、連結酵素により連結することができる。この場合、ギャップ部分が A-T ペアのみ、または C-G ペアのみで構成されるようにプローブヌクレオチド (B) を設計しておけば、添加するモノヌクレオチドをそれぞれ A、T または C、G のみとすることでミスマッチによりアニールしたオリゴヌクレオチドが間違っって伸長されることを防止する方法もとることができる。連結酵素を使用する連結方法については、特開昭 63-22197 号公報および W090/01069 に開示の方法等、公知の手法により行うことができる。本発明において、標的核酸とアニールするオリゴヌクレオチド部分は 6 ~ 40 ヌクレオチド、好ましくは 10 ~ 30 ヌクレオチドの長さのものが使用される。

【0016】 操作 (c) : 操作 (b) で環状化したプローブヌクレオチド (B') を鋳型に、また該プローブヌクレオチド (B') にアニールしたプライマーヌクレオチド (C) を利用して、核酸ポリメラーゼ (D) を用いて核酸合成反応を行う (図 2 (c) 参照)。該操作は、例えば dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) の 4 種のデオキシリボヌクレオチド および DNA ポリメラーゼ (例えば φ29 DNA ポリメラーゼ、M2 DNA ポリメラーゼ、T7 DNA ポリメラーゼ、*Thermus aquaticus* DNA ポリメラーゼ、*Thermus thermophilus* DNA ポリメラーゼ等の核酸合成能力の高い酵素) を用いて、上記環状ヌクレオチドを鋳型にして伸長反応を行わせることによって行われる。この方法は、例えばジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology; 56, 341-361, 1971) に記載されている技術及び条件を用いることができる。これらの酵素は、DNA の二重鎖の部分を剥しながらプライマー伸長物の合成

をすすめていくことができるので、当該操作に先だって、必ずしも標的核酸(A)と環状化プローブヌクレオチド(B')を分離する必要はない。プライマー伸長物は、標的配列と相同な配列を有するので、該伸長物は操作(a)における標的核酸(A)と同様にプローブヌクレオチド(B)の標的核酸として利用される。この一連の操作を繰り返すことにより核酸の特定の配列を簡単に大量に得ることができる。また、プローブヌクレオチド(B)、プライマーヌクレオチド(C)にそれぞれアンチプロモーター配列、プロモーター配列が含まれている場合には、核酸ポリメラーゼとして、プロモーターに

10 応じたRNAポリメラーゼを用いることができる。当該操作は、NTP(ATP, CTP, GTP, UTPの4種のリボヌクレオチド)およびRNAポリメラーゼ(例えば、T7 RNAポリメラーゼ、T3 RNAポリメラーゼ、SP6 RNAポリメラーゼなど)を用いて該環状ヌクレオチドを鋳型にしてRNA合成反応を行わせることにより行われる。RNAポリメラーゼ反応の結果として、プローブヌクレオチド(B)の相補鎖が繰り返し並んだRNAが合成されるが、このRNAを鋳型として逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、このcDNAにプライマーヌクレオチド(C)をアニールさせることにより、繰り返しRNAポリメラーゼを作用させて大量にRNAを合成することも可能である。操作(d):必要により、操作(c)で生成した増幅核酸配列を用いて、操作(a)~(c)を少なくとも一回繰り返す。

## 【0017】

【発明の効果】本発明の増幅法によれば、プローブヌクレオチド(B)の2つの末端が標的核酸(A)にアニールして連結された場合のみ増幅反応が行われる。したがってオリゴヌクレオチドの塩基配列による特異性と、2つの末端が連結される条件を満たす特異性の2つの特異性が要求され、それだけ非特異反応が抑制される。したがって核酸の特定の配列のみを増幅することが可能である。また、ヘリカーゼ様活性を有する核酸ポリメラーゼを用いることにより、環状化したプローブヌクレオチド1分子から複数の核酸配列が生成されるので、効率よく増幅することが可能である。生成した核酸配列を利用して反応をサイクル化することにより、より大量に増幅することもまた可能である。さらに、本発明の増幅法は

40 プローブを増幅する方法ではないので、ミスマッチや非特異的ハイブリダイゼーションにより残存したプローブの増幅がなく、S/N(Signal/Noise)比を増加させることができる。

## 【0018】

【実施例】以下に、本発明の実施例及び比較例を例示することによって、本発明の効果をより一層明確なものとするが、本発明はこれらの実施例によって限定されない。

(実施例1) 各種オリゴヌクレオチドの合成

ABI社DNAシンセサイザー391型を用いて、ホスホアミダイト法にて下記配列のオリゴヌクレオチドを合成した。①プローブヌクレオチド(第一オリゴヌクレオチド①):本オリゴヌクレオチドは腸炎ビブリオTDH(Thermally Stable Direct Haemolysin)遺伝子の87番目から104番目、および105番目から126番目のヌクレオチド配列、T7プロモーター配列と相補的な配列を有する(配列表1)。また、5'末端にリン酸基が結合している。②プライマーヌクレオチド(第二オリゴヌクレオチド②):

10 本オリゴヌクレオチドはT7プロモーターの配列を有する(配列表2)。手法はABI社マニュアルに従い、0.2 μMスケールで実施した。各種オリゴヌクレオチドの脱保護はアンモニア水で55℃で一晩実施した。精製はファルマシア社製FPLCで逆相カラムにて実施した。なお合成したオリゴヌクレオチドは必要により以下の方法で5'末端にリン酸基を結合させた。

オリゴヌクレオチド	5 ~ 20 pmols
10×T4ポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液	10 μl
1 mM ATP	1 μl
T4ポリヌクレオチドキナーゼ	10 単位

水を加えて全量を100 μlとして、37℃で1時間反応させる。ここで、10×T4ポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液とは、

0.5M Tris-HCl(pH8.0)  
0.1M MgCl<sub>2</sub>  
0.1M 2-メルカプトエタノール

を示す。

【0019】(実施例2) 標的核酸を増幅するためのキット

(ア) 実施例1の第一オリゴヌクレオチド①  
(イ) 実施例1の第二オリゴヌクレオチド②  
(ウ) T4 DNAリガーゼ(東洋紡製)、T7 RNAポリメラーゼ(東洋紡製)、ATP、CTP、GTP、UTP

【0020】(実施例3) 実施例2のキットを用いた標的核酸の増幅方法(1)

操作(a) 実施例1の第一オリゴヌクレオチド①0.1 molと、TDH産性腸炎ビブリオの培養菌体から分離、部分精製したゲノム核酸1 μgとを共に10 μlのリガーゼ用反応液に加えた。94℃に2分間保った後、50℃に5分間保

40 温し、アニールさせた。リガーゼ用反応液

66 mM	Tris-HCl(pH7.6)
6.6 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 mM	ジチオスレイトール
66 μM	ATP

操作(b) 上記反応液10 μlに、第二オリゴヌクレオチド②0.1 nmolを加え、操作(a)と同様の操作により、環状化した第一オリゴヌクレオチド①にアニールさせた。

操作(c) 次に、T4 DNAリガーゼ1単位(東洋紡製)を加え、37℃で1時間反応させ、第一オリゴヌクレオチドの5'末端と3'末端を連結させた。

50

操作(d)上記反応液に水40 $\mu$ l、T7 RNAポリメラーゼ反応液50 $\mu$ l、およびT7 RNAポリメラーゼ 10 単位を加え、操作(b)で連結した環状オリゴヌクレオチドを鋳型として、37 $^{\circ}$ Cで30分間保温することにより増幅反応を実施した。

T7 RNAポリメラーゼ反応液

80 mM Tris-HCl (pH8.0)  
10 mM ジチオスレイトール  
4 mM スペルミジン  
8 mM MgCl<sub>2</sub>  
50 mM NaCl  
160  $\mu$ g/ml BSA  
0.02 % トリトン X-100  
2 mM ATP, CTP, GTP, UTP

操作(e)その後、アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色法により合成された RNAを確認した。結果は113merより高分子側に、スミア上にRNAが合成されていた。これは、第一オリゴヌクレオチドが連結され、この環状分子を鋳型として鋳型より長いRNA分子が合成されたことを示している。

【0021】(実施例4)実施例2のキットを用いた標的核酸の増幅方法(2)

操作(a)実施例1の第一オリゴヌクレオチド①0.1nmolと第二オリゴヌクレオチド②0.1nmolとを10 $\mu$ lのリガーゼ用反応液に加えた。94 $^{\circ}$ Cに2分間保った後50 $^{\circ}$ Cに5分間保温し、アニールさせた。

操作(b)上記反応液に、TDE産性腸炎ビブリオの培養菌体から分離、部分精製したゲノム核酸1 $\mu$ gを加え第一オリゴヌクレオチド①とアニールさせ、T4 DNAリガーゼ1単位(東洋紡製)を加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させることにより、第一オリゴヌクレオチドの5'末端と3'末端を連結させた。

操作(c)上記反応液10 $\mu$ lに水40 $\mu$ l、T7 RNAポリメラーゼ反応液50 $\mu$ l、およびT7 RNAポリメラーゼ 10 単位を加え、操作(b)で連結した環状オリゴヌクレオチドを鋳型として、37 $^{\circ}$ Cで30分間保温することにより増幅反応を実施した。

操作(d)その後、アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色法により合成されたRNAを確認した。結果は113merより高分子側に、スミア上にRNAが合成されていた。これは、第一オリゴヌクレオチドが連結され、この環状分子を鋳型として鋳型より長いRNA分子が合成されたことを示している。

【0022】(実施例5)実施例2のキットを用いた標的核酸の増幅方法(3)

操作(a)実施例1の第一オリゴヌクレオチド①0.1nmolと第二オリゴヌクレオチド②0.1nmolとを、TDE産性腸炎ビブリオの培養菌体から分離、部分精製したゲノム核酸1 $\mu$ gと共に10 $\mu$ lのリガーゼ用反応液に加えた。94 $^{\circ}$ Cに2分間保った後、50 $^{\circ}$ Cに5分間保温し、アニールさ

せた。

操作(b)次に、T4 DNAリガーゼ 1単位(東洋紡製)を加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させ、第一オリゴヌクレオチドの5'末端と3'末端を連結させた。

操作(c)上記反応液10 $\mu$ lに水40 $\mu$ l、下記反応液50 $\mu$ l、およびT7 RNAポリメラーゼ10 単位を加え、操作(b)で連結した環状オリゴヌクレオチドを鋳型として、増幅反応を実施した。

操作(d)その後、アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色法により合成されたRNAを確認した。結果は113merより高分子側に、スミア上にRNAが合成されていた。これは、第一オリゴヌクレオチドが連結され、この環状分子を鋳型として鋳型より長いRNA分子が合成されたことを示している。

【0023】(実施例6)実施例2のキットを用いた標的核酸の増幅方法(4)

操作(a)実施例1の第一オリゴヌクレオチド①0.1nmolと、TDE産性腸炎ビブリオの培養菌体から分離、部分精製したゲノム核酸1 $\mu$ gとを共に10 $\mu$ lのリガーゼ用反応液に加えた。94 $^{\circ}$ Cに2分間保った後50 $^{\circ}$ Cに5分間保温し、アニールさせた。

操作(b)

次に、T4 DNAリガーゼ 1単位(東洋紡製)を加え37 $^{\circ}$ Cで1時間反応させ、第一オリゴヌクレオチドの5'末端と3'末端を連結させた。

操作(c)

上記反応液10 $\mu$ lに、第二オリゴヌクレオチド②0.1nmolを加え、操作(a)と同様の操作により、環状化した第一オリゴヌクレオチド①にアニールさせた。次に反応液に水40 $\mu$ l、下記反応液50 $\mu$ l、およびT7 RNAポリメラーゼ 10 単位を加え、操作(b)で連結した環状オリゴヌクレオチドを鋳型として、37 $^{\circ}$ Cで30分間保温することにより増幅反応を実施した。

操作(d)

その後、アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色法により合成されたDNAを確認した。結果は113merより高分子側に、スミア上にRNAが合成されていた。これは、第一オリゴヌクレオチドが連結され、この環状分子を鋳型として鋳型より長いRNA分子が合成されたことを示している。

【配列表】

【0024】配列番号: 1

配列の長さ: 113

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号: promoter

存在位置: 22..38

特徴を決定した方法：S

他の特徴：T7プロモーター配列と相補的な配列

存在位置：1..18

他の特徴：腸炎ビブリオTDH(Thermostable Direct Haemolysin) 遺伝子の105番目から126番目の配列と相補的な配列

\* 存在位置：92..113

他の特徴：腸炎ビブリオTDH(Thermostable Direct Haemolysin) 遺伝子の87番目から104番目の配列と相補的な配列

GATGAGATAT TGTTTGTGT TCAAATCTCC CTATAGTGAG TCGTATTAAA ACTATTCTAT 60  
AGTGTCACCT AAATGATCCA CTAGTTCTAG AGCGGTTTCC TGCCCCCGGT TCT 113

【配列表】

【0025】配列番号：2

配列の長さ：17

配列の型：核酸

トポロジー：一本鎖

配列の種類：他の核酸 合成DNA

TAATACGACT CACTATA

【図面の簡単な説明】

【図1】第一オリゴヌクレオチド（プローブヌクレオチド）の構造を示した図である。

【図2】本発明の原理を模式的に示した図である。

【図3】実施例3、4、5および6において合成されたRNAの電気泳動パターンを示す。

【符号の説明】

図2中、Aは標的核酸、Bは第一オリゴヌクレオチド

※配列の特徴

10 特徴を表す記号：promoter

存在位置：1..17

特徴を決定した方法：S

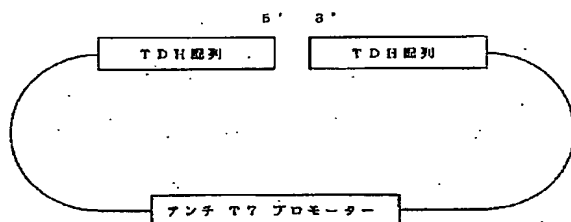
他の特徴：T7プロモーターの配列を有する

※ 配列

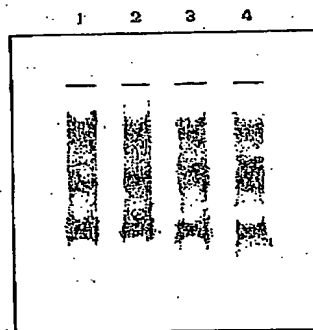
17

（プローブヌクレオチド）、B'は環状化した第一オリゴヌクレオチド、Cは第二オリゴヌクレオチド（プライマーヌクレオチド）およびDは核酸ポリメラーゼを示す。図3中、レーン1、2、3および4はそれぞれ実施例3、4、5および6の試料に対応している。矢印は、鋳型として用いた第一オリゴヌクレオチドの位置を示す。

【図1】

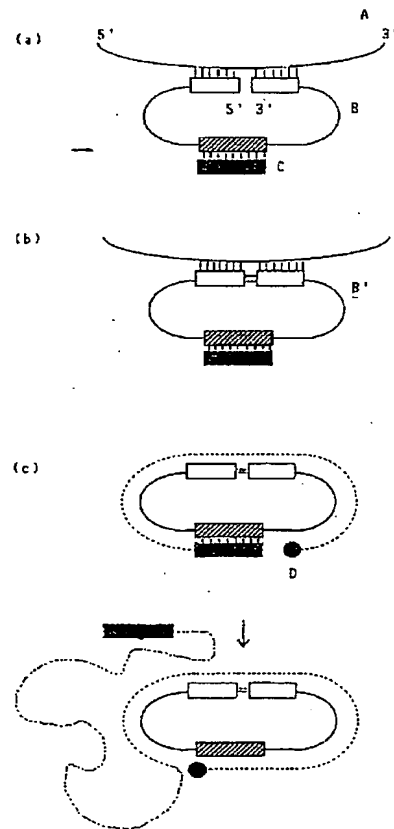


【図3】





【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>

A 6 1 B 10/00

識別記号 庁内整理番号

H 7831-4C

F I

技術表示箇所

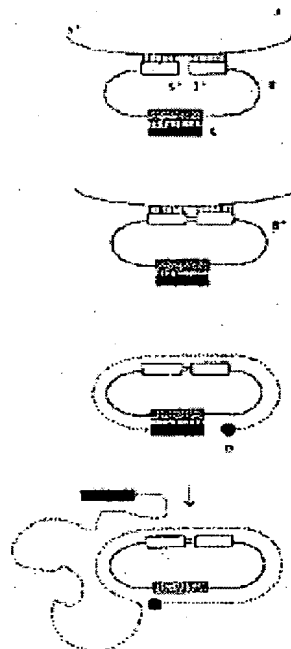
**METHOD FOR AMPLIFYING NUCLEIC ACID SEQUENCE AND REAGENT KIT THEREFOR**

**Patent number:** JP4262799  
**Publication date:** 1992-09-18  
**Inventor:** AONO TOSHIYA; TAKARADA YUTAKA  
**Applicant:** TOYO BOSEKI  
**Classification:**  
- **international:** A61B10/00; C12N15/10; C12Q1/68  
- **europaen:**  
**Application number:** JP19910046193 19910218  
**Priority number(s):** JP19910046193 19910218

**Abstract of JP4262799**

**PURPOSE:** To efficiently amplify a single-stranded nucleic acid by treating a specimen with a straight-chain probe nucleotide having a sequence circularizeable with the target nucleic acid in the specimen, and by using the product as the template, producing a single-stranded nucleic acid complementary to the template using a primer nucleotide.

**CONSTITUTION:** A target nucleic acid sequence A is hybridized with a straight-chain probe nucleotide B designed so as to circularize as a result of existence of a target nucleic acid sequence A using a primer nucleotide C having sequence which is at least partially complementary to the straight-chain probe nucleotide B to circularize the straight-chain probe nucleotide B. By using the resultant circular probe nucleotide B' as a template and utilizing the primer nucleotide C, a single stranded nucleic acid sequence is amplified by amplifying a repeated sequence complementary to the template.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**